

# Patogênese dos Tumores Diferenciados da Tiróide (Papilífero e Folicular)

atualização

## RESUMO

Os carcinomas diferenciados da tiróide, o papilífero (PTC) e o folicular (FTC) são as neoplasias endócrinas mais comuns. Descobertas recentes esclareceram diversos aspectos de sua patogênese, analisados nesta revisão. No PTC, uma única mutação no gene *BRAF* (o gene da Raf quinase tipo B) (V600E) é responsável pela doença em 40-50% dos pacientes, especialmente os mais velhos e os que apresentam subtipos histológicos mais agressivos. Tendo em vista esses fatores prognósticos da mutação *BRAF*, o uso de sua pesquisa no material proveniente do exame citológico de tiróide pode ser útil para fins de diagnóstico e conduta. A outra causa freqüente de PTC são os rearranjos *RET/PTC*, decorrentes da quebra e fusão do domínio TK intra-celular de *RET* com fragmentos 5' de diversos genes, resultando num gene quimérico que produz uma proteína que apresenta atividade constitutiva de uma tirosina quinase de *RET*, presentes em 20-30% dos pacientes, especialmente os mais jovens ou que receberam radiação. Já a patogênese do FTC é menos compreendida. Descreve-se a participação do gene decorrente da fusão entre *PAX8* e *PPAR $\beta$*  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta$* ) em 30-50% dos pacientes com este tumor; entretanto, esta fusão pode ocorrer também em adenomas foliculares. Desta forma, ainda não há evidência completa de que *PAX8-PPAR $\beta$*  seja a causa do FTC. Outro achado no FTC são as mutações no gene *RAS* quando ocorrem mutações do *RAS* não acontece o rearranjo *PAX8-PPAR $\beta$* . Outra possível causa de FTC é a perda ou expressão exagerada de uma série de genes, alguns demonstrados por técnicas de expressão diferencial de genes, como *TR $\beta$* , *PTEN*, *PKAR1A*, *DDIT3*, *ARG2*, *ITM1* e *C1orf24*. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/5:691-700)

**Descritores:** Carcinoma papilífero da tiróide; Carcinoma folicular da tiróide; *RET*; *BRAF*; *RET/PTC*; *RAS*; *PAX8/PPAR $\beta$*

## ABSTRACT

### Pathogenesis of Differentiated Thyroid Cancer (Papillary and Follicular).

Differentiated thyroid cancers (papillary - PTC and follicular - FTC) are the most common endocrine malignancies. The recent progresses in the understanding of PTC and FTC pathogenesis are summarized in this review. In PTC, a single mutation of *BRAF* (the gene for the B-type Raf kinase) (V600E) is responsible for the disease in 40-50% of patients, especially in older people and is associated with a poorer clinicopathological outcome. Due to these characteristics, its use as a specific diagnostic and prognostic marker for PTC in cytological specimens is being implemented. Another important cause of PTC is rearrangements of the *RET* tyrosine kinase receptor (*RET/PTC*), which represent a recombination of the promoter and N-terminal domain of a partner gene with the C-terminal region of the *RET* gene, resulting in a chimeric gene with a protein product containing a constitutively

Rui M.B. Maciel  
Edna T. Kimura  
Janete M. Cerutti

Laboratório de Endocrinologia Molecular, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Medicina (RMBM, JMC) e Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia (JMC), Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; Disciplina de Histologia e Embriologia, Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (ETK); e Fleury - Centro de Medicina Diagnóstica (RMBM), São Paulo, SP.

Recebido em 24/07/05  
Revisado em 29/07/05  
Aceito em 04/08/05

activated RET tyrosine kinase, responsible for 20-30% patients, specially the younger or after radiation. The pathogenesis of FTC is less understood. A chromosomal translocation between the transcription factor PAX8 and the peroxisome proliferator-activated receptor $\beta$  (PPAR $\beta$ ) occurs in 30-50% of patients; however, the presence of PAX8-PPAR $\beta$  is also demonstrated in follicular adenomas. Therefore, there is no complete evidence that PAX8-PPAR $\beta$  is the cause of FTC. Another finding in FTC is mutations on the RAS gene, which excludes PAX8-PPAR $\beta$  rearrangements. Several genes, as TR $\beta$ , PTEN, PKARIA, DDIT3, ARG2, ITM1 and C1orf24 - some discovered by techniques of differential gene expression -, have been recently implicated in the pathogenesis of FTC. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/5:691-700)

**Keywords:** Papillary thyroid carcinoma; Follicular thyroid carcinoma; RET; BRAF; RET/PTC; RAS; PAX8/PPAR $\beta$

OS CÂNCERES DE TIRÓIDE são as neoplasias endócrinas mais freqüentes. Classificam-se histologicamente em tumores derivados das células foliculares (carcinomas papilífero, folicular e anaplásico) e das células C ou para-foliculares (carcinoma medular) da tiróide (1). O carcinoma papilífero da tiróide (PTC, do inglês *papillary thyroid carcinoma*) é o mais freqüente, abrangendo aproximadamente 80% dos casos, seguindo-se do carcinoma folicular da tiróide (FTC, do inglês *follicular thyroid carcinoma*) com 15% dos casos, do carcinoma medular da tiróide (MTC, do inglês *medullary thyroid carcinoma*) com 3% dos casos e do carcinoma anaplásico da tiróide (ATC, do inglês *anaplastic thyroid carcinoma*) com 2% dos casos (2).

A patogênese molecular dos carcinomas da tiróide, que tem sido freqüentemente visitada nestes Arquivos (3-5), está hoje melhor definida na maior parte de seus subtipos, uma vez que diversas causas genéticas têm sido recentemente descritas. No PTC destacam-se as translocações e inversões que causam a recombinação do gene RET com genes heterólogos dando origem ao gene quimérico RET/PTC, as mutações ativadoras e translocações no gene BRAF e no gene RAS. No FTC, as mutações ativadoras do gene RAS e o oncogene resultante da fusão PAX-8/PPAR $\beta$ . Nos MTC familiares, as mutações ativadoras do gene RET, enquanto que nos carcinomas anaplásicos, as mutações no gene P53 (6-8).

Neste artigo abordaremos a patogênese dos tumores diferenciados, PTC e FTC. Para sua compreensão é fundamental o entendimento da via

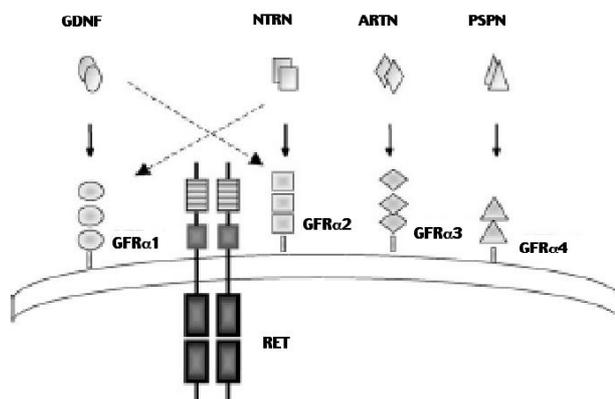
RET→Ras→Raf→MAP quinase/ERK quinase, que descreveremos a seguir.

### SINALIZAÇÃO DA RET-TIROSINA QUINASE

O gene RET (*rearranged during transfection*) está localizado no cromossomo 10q11.2 e contém 21 exons que ocupam mais de 60kb do DNA genômico (9,10). O gene RET codifica um receptor transmembrana com atividade tirosina-quinase (TK, do inglês *tyrosine-kinase*) que se expressa nos tecidos derivados da crista neural e das células uro-genitais durante a embriogênese (9,10).

A proteína RET é composta por 3 domínios: o domínio extra-celular, que contém a região de associação com o ligando composta por quatro repetições com homologia à caderina e pela região rica em cisteína; o domínio transmembrana hidrofóbico e o domínio intra-celular, que apresenta as regiões ricas em TK (figura 1). Três variantes de RET (RET9, RET43 e RET51) são geradas por "splicing alternativo" da região 3', das quais o RET9 e o RET51 são as principais isoformas e contém 1072 e 1014 aminoácidos respectivamente (figura 1).

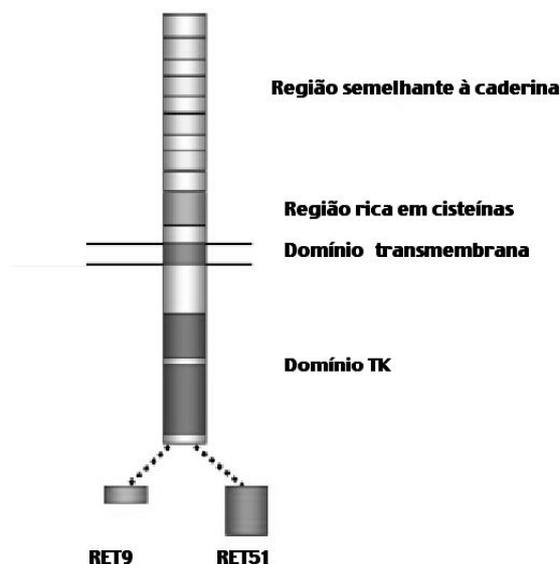
O RET permaneceu um receptor órfão até 1996, quando se identificou o seu ligante, o fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia (GDNF, do inglês *glial cell-derived neurotropic factor*). Atualmente existem outros 3 membros da família do



**Figura 1.** Esquema da família de ligantes GDNF (GFLs) e seus receptores. GFLs homodiméricos ativam o RET e suas TK pela ligação de alta afinidade aos receptores GFR $\beta$  ligados com glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). A ligação desse complexo ao RET inicia a homodimerização, fosforilação dos resíduos TK e sinalização intra-celular subsequente. As flechas sólidas indicam as interações funcionais preferenciais entre os ligantes e receptores; as flechas interrompidas indicam possíveis reações cruzadas. GDNF: fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia; NRTN: neurturina; ARTN: artemina; PSPN: persefina (modificada da referência 9).

GDNF: a neurturina (NTN), a artemina (ARTN) e a persefina (PSP). A associação de RET aos seus ligantes é mediada por co-receptores que não apresentam domínio intra-celular e encontram-se ancorados na membrana devido à associação de alta-afinidade com o glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Estes receptores, denominados GFRβ1, GFRβ2, GFRβ3 e GFRβ4, ligam-se de modo preferencial a GDNF, NTN, artemina e PSP, respectivamente (9,10). Embora exista mais de um modelo proposto para a ativação de RET, o modelo em *trans* parece fornecer explicações mais plausíveis. Neste modelo, formam-se primeiramente os complexos ligante-receptor, que associam-se a seguir a duas moléculas de RET, o que promove sua ativação. Este processo de transativação causa a fosforilação dos resíduos de tirosina no domínio TK e o início da transdução do sinal que potencializa os efeitos do GDNF como, por exemplo, a promoção da sobrevivência, diferenciação e migração das células da crista neural (figura 2) (9,10). A resposta fisiológica requer, além da formação deste complexo multimérico, a presença de TGF-β e de glicosaminoglicanos (9).

O RET ativado induz diferentes vias de sinalização intra-celular, na dependência da tirosina quinase envolvida. O domínio intracelular do RET contém de 16 (RET9) a 18 (RET51) resíduos intracelulares de TK, 4 deles sendo sítios de atracção de proteínas contendo módulos de adaptação específicos,

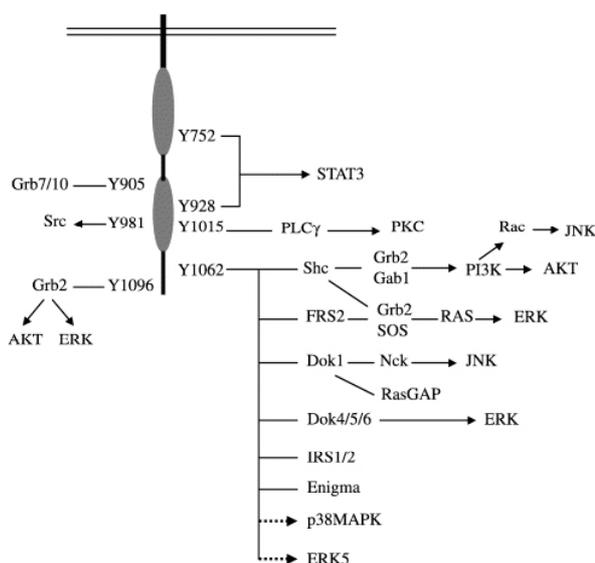


**Figura 2.** Estrutura esquemática da proteína RET mostrando a região semelhante à caderina, a região rica em cisteína e os domínios trans-membrana e tirosina-quinase (TK). As duas maiores isoformas de RET, RET9 e RET51 são indicadas (modificada da referência 9).

como por exemplo Src homólogo 2 [SH2]. Uma vez fosforiladas, algumas tirosinas ligadas ao RET (Tyr905, Tyr1015 e Tyr1096) associam-se às proteínas adaptadoras específicas Grb7/Grb10, fosfolipase Cβ e Grb2, respectivamente. A Tyr1062, entretanto, pode se associar a vários efetores como, por exemplo, Shc, IRS1/2, FRS2, Dok e Enigma (figura 3). A formação desses complexos estimula vias de sinalização diferentes. A Tyr1062, por meio da via Shc e recrutamento de Grb2, leva à ativação de Ras/RAF/ERK e por meio de Shc e o recrutamento de Gab induz a ativação da via fosfatidil-inositol-3 quinase (PI3K/AKT) (figura 3).

As células C, derivadas da crista neural, expressam o gene *RET* durante a fase embrionária, mas este não se expressa nas células C durante a vida adulta. Mutações ativadoras do gene *RET* causam as formas familiares do MTC (que serão abordadas em outro artigo desta série).

As células foliculares da tiróide, por sua vez, não expressam o gene *RET*. Entretanto, várias alterações genéticas nas células foliculares tiroideanas exercem sua atividade oncogênica, pelo menos parcialmente, através da ativação da RET/PTC→RAS→RAF→MAP→



**Figura 3.** Esquema das vias de sinalização mediadas por RET. Y752, Y905, Y928, Y981, Y1015, Y1062, Y1096: tirosinas fosforiladas; Dok 1/4/5/6: *downstream of tyrosine kinase 1/4/5/6*; ERK: *extracellular signal-regulated kinase*; FRS2: *fibroblast growth factor receptor substrate 2*; Gab1: *Grb2 associated binding protein 1*; Grb2: *growth factor receptor bound protein 2*; JNK: *c-Jun N-terminal kinase*; Nck: *non-catalytic region of tyrosine kinase*; PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*; PKC: *protein kinase C*; PLCβ: *phospholipase Cβ*; STAT3: *signal transducer and activator of transcription*; Ras: *rat sarcoma oncogene*; RasGAP: *ras-GTPase activating protein* (modificada da referência 10).

ERK→MAP quinase. Como mencionado, em PTC nos genes *RAS*, *RET* e *BRAF* e em FTC no gene *RAS*.

#### **ALTERAÇÕES NO GENE *BRAF* NO PTC**

A causa mais comum do PTC é uma única mutação no gene *BRAF*, presente em 50% dos casos na dependência da idade e do sub-tipo histológico. Há 3 isoformas da quinase serina-treonina RAF nas células de mamíferos, A-RAF, B-RAF e C-RAF(RAF1); C-RAF é expressa de modo ubíquo, enquanto que B-RAF é altamente expressa em neurônios e testículos e em menores níveis nas células hematopoiéticas e na tiróide. Seu interesse em oncologia deriva-se da observação da presença de mutações ativadoras do gene *BRAF* em diversos tipos de câncer, dos quais o mais prevalente é o melanoma, que apresenta mutação em aproximadamente 70% dos casos (11,12).

Vários estudos nos últimos 2 anos demonstraram, depois da observação pioneira de Kimura e cols. (13), que uma mutação no gene *BRAF* está presente na maioria dos casos de PTC (29 a 83%) (6,7). Trata-se de uma mutação somática do tipo transverso de timina para adenina (T1799A) no exon 15 de *BRAF*, que causa a substituição, na proteína, do aminoácido valina por glutamato (V600E). Esta mutação produz a ativação constitutiva da BRAF quinase, pois insere um resíduo carregado negativamente adjacente a um sítio de fosforilação (Ser599), o que causa a ruptura de interações hidrofóbicas entre resíduos exatamente no local de ligação de ATP que mantinha a conformação inativa (14,15). Além disso, demonstrou-se recentemente que a super-expressão do BRAF mutado em células tiroideanas de camundongos transgênicos causa PTC (16).

Cerca de 30 artigos publicados na literatura entre 2003-2005 referentes a pacientes adultos, com casuísticas apresentando diversidade geográfica, étnica e dos sub-tipos histológicos dos tumores, evidenciaram a presença da mutação T1799A em 810/1856 casos de PTC (44%), 0/165 de FTC (0%), 23/94 (24%) de carcinoma anaplásico da tiróide (ATC), 0/542 (0%) de neoplasias benignas da tiróide e 0/65 (0%) de carcinoma medular de tiróide (MTC) (6). Desta forma, há forte evidência clínica de que essa mutação está presente apenas em PTC e em alguns ATC (talvez derivados de PTC), mas nunca em FTC, neoplasias benignas da tiróide e MTC. Além disso, é também a mutação mais prevalente entre todas as alterações genéticas no câncer de tiróide.

Os dados da literatura evidenciam que a mutação T1799A mostra prevalência variável na dependência do sub-tipo de PTC, sendo maior na forma mais agressiva (tumor de células altas com 37/48 casos, 77%), intermediária na forma clássica (246/411 dos casos, 60%) e menor na forma variante folicular (21/175, 12%) (6). Interessantemente, as formas clássica e de células altas são as que apresentam maior incidência de metástases para os linfonodos cervicais, o que reforça o papel da mutação do *BRAF* como uma força motriz na evolução do PTC. A mutação *BRAF* deve ocorrer precocemente no desenvolvimento de PTC, pois tem se evidenciado sua presença em microcarcinomas papilíferos (17).

Outro aspecto fascinante da mutação *BRAF* é o fato de ela ser mutuamente exclusiva relativamente às demais alterações genéticas presentes no câncer de tiróide, ou seja, não há descrição de mutações *BRAF* em casos onde foram identificados rearranjos *RET/PTC* ou *RAS* (13,17-21); de certa forma, esse fato não seria surpreendente, pois, como vimos, essas alterações genéticas estão na mesma via da MAP quinase e bastaria apenas uma delas para causar a tumorigênese. Esta proximidade na via da MAP quinase (entre a mutação *BRAF*, o rearranjo *RET/PTC* e *RAS*) deve ser a razão do fenótipo semelhante observado no PTC, diferentemente das alterações genéticas presentes em pontos distintos da via e observadas em FTC ou MTC, o que foi comprovado em trabalho recente de Melillo e cols., que evidenciaram que *RET/PTC*, *RAS* e *BRAF* induzem a proliferação e invasividade das células foliculares da tiróide por ativarem um programa estimulatório comum dos genes das quimoquinas *CXCL1* e *CXL10* e seus receptores (22).

A idade de início de apresentação da doença nos pacientes que apresentam a mutação *BRAF* também diverge daqueles que apresentam rearranjo *RET/PTC*; de modo geral, a idade é um fator importante na determinação da dominância dessas alterações, pois o rearranjo *RET/PTC* tende a ocorrer em crianças vítimas do acidente de Chernobyl, enquanto que a mutação *BRAF*, em adultos. Nos casos de PTC descritos em crianças vítimas do acidente nuclear em Chernobyl, imaginava-se que a radiação *per se* seria a força maior na gênese do rearranjo *RET/PTC*; porém, estudos recentes com adultos de Chernobyl com PTC evidenciam baixa prevalência de *RET/PTC* e elevada prevalência da mutação *BRAF*, independente de história de radiação (19,21). Desta forma, acredita-se que as células foliculares das crianças apresentem uma propriedade intrínseca de serem mais susceptíveis para

rearranjos cromossômicos e que a radiação favoreça essa ocorrência (7).

Outra vantagem da descoberta da existência da mutação *BRAF* no PTC tem sido sua utilização potencial no diagnóstico e no prognóstico do câncer de tiróide. A pesquisa da mutação pode melhorar a qualidade da citologia aspirativa do nódulo de tiróide, pois além de confirmar os casos com diagnóstico citológico sugestivo de PTC, pode discriminar com certeza casos duvidosos; assim, em estudo recente, 7/53 (13%) amostras com diagnóstico de benignidade e 1/14 (7%) amostras com diagnóstico de tiroidite foram positivas para *BRAF* e, em consequência, o diagnóstico foi corrigido para PTC (23). Outro estudo evidencia que 8% das citologias com diagnóstico indeterminado são positivas para *BRAF* (24). Além disso, a presença de *BRAF* está relacionada a pior prognóstico, como a associação com invasão extra-tiroideana, estágio avançado e metástases (6,20). Entretanto, os casos negativos para a mutação não excluem malignidade e devem ser vistos com cautela, principalmente nos casos de PTC multifocais, onde somente um dos nódulos foi investigado na citologia.

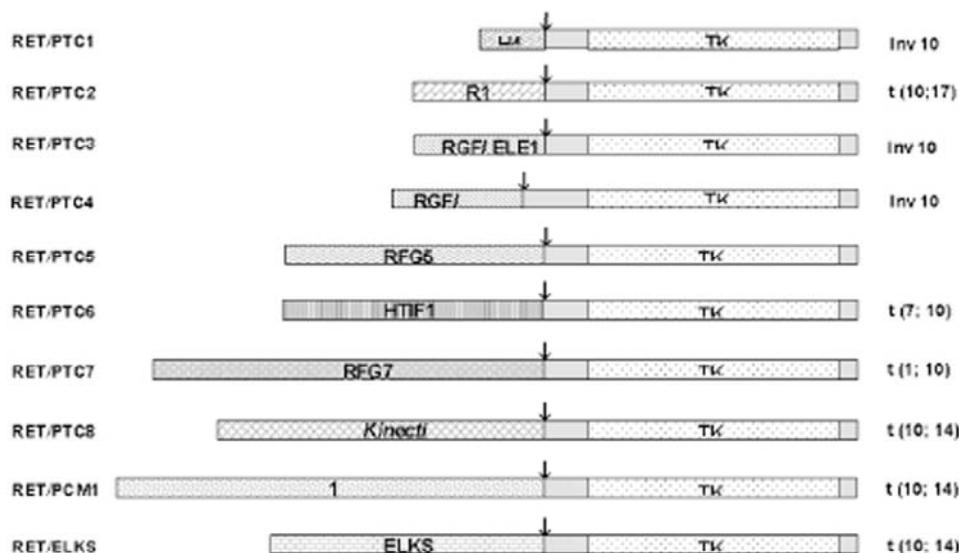
Recentemente, outras mutações raras de *BRAF* têm sido descritas em PTC: K601E na forma variante folicular (17) e a fusão do gene *BRAF* com *AKAP9* por uma inversão paracêntrica do braço longo do cromossoma 7, resultando num oncogene recombinante que ocorre em PTC induzido por radiação (25). Interessantemente, nosso grupo descreveu uma nova mutação no gene *BRAF*, presente nas metástases para

linfonodos em PTC, mas ausente no tumor primário, o que seria consistente com um papel facilitador de *BRAF* na progressão do PTC nos linfonodos (26). Esta mutação, uma deleção de 3 nucleotídeos, resulta na substituição V600E e na deleção do aminoácido 601 (V600E+delK601). Uma mutação em *tandem* (GTG>GAA) no gene *BRAF*, que também resulta na substituição V600E, foi identificada em metástases para linfonodos de PTC (27).

É possível que exista também um potencial terapêutico nos casos de mutação *BRAF*. Como se sabe, especialmente nos pacientes mais idosos (provavelmente *BRAF* positivos), freqüentemente o PTC evolui com invasão local para músculo e traquéia e apresenta metástases recorrentes para linfonodos. Para esses casos, o tratamento habitual com tireoidectomia total e ablação com radioiodo não cura os pacientes, e haveria a indicação do uso de inibidores das RAF quinases, que apresentam resultados encorajadores *in vitro* e em animais. Um desses inibidores, o Bay 43-9006, apresenta capacidade de inibir o mutante V600E em células derivadas de PTC (28).

#### REARRANJOS DO GENE *RET* E OUTRAS CAUSAS DE PTC

A segunda causa mais comum da patogênese do PTC são os rearranjos *RET*/PTC, presentes em até 30% dos casos na dependência de idade, sub-tipo histológico e radiação. O gene *RET* não é expresso normalmente



**Figura 4.** Representação esquemática do produto do gene *RET* e de algumas formas de rearranjos *RET*/PTC encontrados em PTC. Indicam-se no esquema a região semelhante à caderina (Cad), a região rica em cisteínas (Cys), a região transmembrana (TM), o domínio quinase da tirosina (TK) e os pontos de quebra em PTC (setas) (modificada da referência 5).

nas células foliculares da tiróide; porém, a expressão aberrante de várias formas de RET pode ocorrer exclusivamente no carcinoma papilífero da tiróide. A ativação de RET deve-se a rearranjos cromossômicos entre o gene RET com genes heterólogos, o que causa a fusão destes novos parceiros com a formação de genes quiméricos denominados RET/PTC (7-9).

Já se descreveram até hoje 12 tipos de RET/PTC, RET/PTC 1-9, PCM1-RET, ELKS-RET e RPF-RET, sempre decorrentes da quebra e fusão do domínio TK intra-celular de RET com fragmentos 5' de diversos genes (figura 4). Assim, o primeiro desses rearranjos a ser descrito, o RET/PTC1, é uma quimera resultante da fusão da região tirosina-quinase (TK) do oncogene RET com a região terminal 5' de outro gene, chamado H4/D10S170, ambos localizadas no cromossomo 10. Tal união é devida a um rearranjo intra-cromossômico do tipo inversão paracêntrica, localizado no braço longo do cromossomo 10, inv (10q11.2-10q21): assim, uma seqüência de 354 pares de bases do gene H4 substitui a região truncada do oncogene RET. Por sua vez, o RET/PTC2 é formado pela translocação recíproca entre os cromossomos 10 e 17, o que resulta numa justaposição do domínio TK do RET com uma porção da sub-unidade regulatória RI $\beta$  da PKA dependente de cAMP. O RET/PTC3, por outro lado, é o resultado do rearranjo intra-cromossômico formado pela fusão dos genes RFG/ELE1/ARA70 (figura 4) (9). As recombinações mais freqüentemente encontradas até agora pela literatura são variantes de RET/PTC1 e RET/PTC3, embora outras combinações tenham sido descritas, especialmente em casos de carcinoma papilífero de crianças expostas à radiação em Chernobyl (7-9). A característica comum aos genes que se fundem ao RET é a capacidade de se expressarem de forma onipresente, o que permite o aparecimento da forma alterada do gene RET nas células foliculares, local onde este gene normalmente não se expressa. Todas as formas de rearranjos identificadas apresentam uma característica em comum, ou seja, a perda dos domínios extra-celulares e parte do domínio transmembrana de RET, devido à quebra que ocorre sempre dentro do exon 11, que codifica para o domínio transmembrana. Conseqüentemente, a proteína aberrante sofre sub-localização da membrana para o citoplasma. Da mesma forma, todos os rearranjos RET/PTC são genes quiméricos constitutivamente ativados que apresentam sinalização controlada pelo fragmento N-terminal presente nos diversos genes parceiros nas correspondentes fusões (7-9).

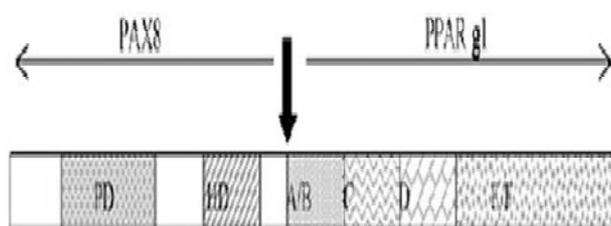
A freqüência da ativação do oncogene RET/PTC em pacientes com carcinoma papilífero da tiróide

varia entre as diferentes áreas geográficas. De fato, enquanto 33% dos pacientes italianos apresentam ativação do oncogene RET/PTC, a freqüência foi muito menor entre os japoneses, oscilando de 3 a 9%. Mais recentemente, diversos laboratórios têm relatado até 60% de ativação de RET/PTC em amostras de câncer papilífero de tiróide provenientes de crianças expostas à radiação em Chernobyl ou à radiação externa para o tratamento de doenças benignas da cabeça e pescoço (9,29). Além da exposição à radiação, outro fator que pode estar relacionado à presença de rearranjos tipo RET/PTC é a idade de aparecimento do tumor, pois a porcentagem de casos positivos para rearranjos de RET/PTC é muito maior nos indivíduos jovens. Estes resultados sugerem que diferenças genéticas, de idade e/ou fatores ambientais podem alterar a freqüência de rearranjo deste gene. Nossa casuística de São Paulo evidencia a presença de rearranjos RET/PTC em 25% dos casos estudados de PTC.

Vários trabalhos evidenciam que os rearranjos RET/PTC estão relacionados à patogênese do carcinoma papilífero. Assim, uma elevada proporção de focos ocultos de carcinomas papilíferos, considerados os precursores dessa doença, apresentam imunoreatividade para RET ou ainda a presença do RNA mensageiro (mRNA) de RET/PTC identificada por RT-PCR (*reverse-transcriptase polymerase chain reaction*) (30); além disso, uma super-expressão de RET/PTC1 ou RET/PTC3 em células tiroideanas de camundongos transgênicos provocam tumores com histologia típica de carcinoma papilífero (9); finalmente, a irradiação de tecido fetal humano *in vitro* induz os rearranjos RET/PTC de uma maneira dose-dependente (7,9).

A possível explicação molecular para a ocorrência deste tipo de genes quiméricos está relacionada ao fato de que os *loci* cromossômicos participantes do rearranjo RET/PTC (por exemplo, RET e H4) estão justapostos durante a interfase em tecido humano tiroideano normal, oferecendo, desta forma, um alvo para a radiação induzir quebras no DNA que causariam uma recombinação não-homóloga das partes. Assim, a arquitetura cromossômica durante a interfase pode ser um pré-requisito importante para a recombinação do RET nas células tiroideanas; a despeito da distância linear (30 megabases no caso de H4 e RET), a contigüidade física dos genes envolvidos durante a interfase aumenta a chance de recombinação ilegítima após exposição a agentes genotóxicos (9,31).

Outras alterações genéticas são encontradas nos PTC, mas em freqüência muito menor, como os rearranjos NTRK1, a partir de outro receptor de TK



**Figura 5.** Representação esquemática do rearranjo PAX8/PPAR $\beta$ . O rearranjo une os domínios de PAX8 (exons 7, 8 ou 9) aos domínios nucleares da proteína PPAR $\beta$  (exon 1). Estão indicados no esquema o ponto de quebra (seta), os domínios pareado e parcial de ligação ao DNA de PAX8 e domínios de PPAR $\beta$  (A-F) (modificada da referência 5).

ativado em PTC. De modo semelhante ao RET, a ativação do NTKR1 é causada por rearranjos cromossômicos que produzem a fusão da parte final do gene 3' do NTRK1 com a região 5' de 3 diferentes genes, TPM3, TPR e TFG (9). A ocorrência de mutações ativadoras de RAS, encontradas comumente em FTC, é controversa no PTC, pois os resultados da literatura são conflitantes (9).

### ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO FTC

A patogênese do FTC não é tão bem esclarecida como a descrita no PTC. Algumas alterações genéticas, entretanto, têm sido evidenciadas, como o gene decorrente da fusão entre PAX8 e PPAR $\beta$  e mutações no gene RAS, além da expressão ou perda de uma série de genes demonstrados por técnicas de expressão diferencial de genes.

Em 2000, Kroll e cols. identificaram a translocação cromossômica do DNA do domínio de ligação de um fator de transcrição da tiróide, o PAX8, aos domínios A a F do gene PPAR $\beta$  (do inglês *peroxisome proliferator-activated gamma*) nos tecidos de pacientes com FTC (33) (figura 5). PPARs são receptores hormonais nucleares pertencentes a um sub-grupo da super-família de receptores nucleares (junto com receptores para os hormônios da tiróide (TRs), ácido retinóico e vitamina D), que requerem para a sua ação e conseqüente ativação do gene-alvo a dimerização com RXR. PPAR $\beta$  tem um papel fundamental na expressão de diversos genes envolvidos na diferenciação dos adipócitos, estocagem de lipídes e sensibilidade a insulina, além de exercer papel no ciclo celular, inflamação, aterosclerose e carcinogênese.

Este gene quimérico, PAX8-PPAR $\beta$ , t(2;3)(q13;p25), estava presente em 5/8 casos de FTC (63%) na descrição original, mas em nenhum dos casos

de adenoma folicular, hiperplasia multinodular e PTC, sugerindo que sua presença poderia diferenciar o FTC do adenoma folicular (33). Posteriormente, outros grupos, incluindo o nosso, reportaram a ocorrência de PAX8-PPAR $\beta$  não apenas em FTC (33-56%), mas também em adenomas foliculares (8-55%) (34-36). Em trabalhos posteriores, o grupo de Kroll reforça a posição de que o rearranjo está presente nos casos típicos ou mais agressivos de FTC com invasão vascular e que a sua positividade nos casos de adenoma folicular notada por outros autores deve indicar a presença de carcinomas foliculares *in situ* (37). Desta forma, o papel do rearranjo PAX8-PPAR $\beta$  na gênese molecular do FTC não é consensual na literatura. Além disso, seu impacto funcional não está estabelecido, pois quando o transfectaram para células heterólogas, não houve estímulo dos elementos responsivos a PPAR, nem mesmo na presença de agonistas, como a troglitazona (7).

Interessantemente, outro estudo do mesmo grupo indica que o rearranjo PAX8-PPAR $\beta$  deve apresentar uma via de ação distinta daquela de RAS, pois numa série de 88 pacientes com FTC verificaram mutações do RAS em 49% e rearranjos PAX8-PPAR $\beta$  em 36%, com apenas 1 paciente apresentando ambas alterações (3%), o que demonstra a mútua exclusividade entre estas duas aberrações genéticas (38).

Há anos sabe-se que FTC apresenta mutações ativadoras dos genes RAS; estes incluem as isoformas H-RAS, K-RAS, N-RAS, que sintetizam um grupo de proteínas de 21kDa com importante papel na tumorigênese e na progressão tumoral em grande variedade de tecidos. A proteína RAS ativada desencadeia a via de sinalização intracelular ERK-MAPK. Mutações de RAS, encontradas predominantemente nos códons 12, 13 e 61, são notadas em ampla gama de tumores humanos (30%), inclusive na tiróide (5). Além da mutação que ativa a proteína RAS constitutivamente, a amplificação do gene ocasiona instabilidade genômica, propiciando o aparecimento de outras mutações que causam a progressão da transformação neoplásica. Em estudos *in vitro* e *in vivo*, onde se introduzem mutações de RAS em células foliculares tireoidianas, observa-se atividade oncogênica, com indução da proliferação e desdiferenciação das células. Mutações do RAS são mais comumente encontradas em ATC (58%), seguidas por FTC (32%), adenoma folicular (35%), PTC (18%) e, em menor número, em adenomas hiperfuncionantes (7%) (5). As mutações no RAS são consideradas eventos precoces da tumorigênese tiroideana, pois são observadas em lesões benignas de tiróide. Carcinomas apresentam frequência maior de mutação RAS; entretanto, sua presença

não é um indicador útil para prognóstico de comportamento agressivo em tumores de tiróide (5).

Nos últimos anos tem-se descoberto diversos genes que podem estar relacionados à patogênese do FTC. Entre esses genes incluem-se aqueles ligados a síndromes familiares de neoplasias foliculares que também apresentam FTC em seu quadro clínico, mutações no TRb em modelos de FTC em camundongos, outros genes apontados por estudos de expressão diferencial de genes no FTC, além de alterações epigenéticas.

Entre os primeiros destacam-se o PTEN, gene supressor tumoral, que codifica uma fosfatase das vias AKT e PIK3 (figura 3) e cuja inativação causa 80% dos casos da síndrome de Cowden, caracterizada por hamartomas múltiplos e FTC em 10% dos casos. Por isso é que se imagina que uma diminuição na expressão de PTEN possa causar FTC, o que é sugerido pelo achado de aumento de ativação de PIK3 e AKT em alguns FTC (39). Outro gene que pode estar envolvido na gênese de FTC é aquele relacionado ao complexo de Carney, doença autossômica dominante caracterizada por mixomas cardíacos e tumores endócrinos, causados por mutações inativadoras do gene codificador da sub-unidade regulatória 1A da PKA dependente de AMPc (PKARIA) (40).

Cheng e cols. demonstraram que FTC desenvolve-se rapidamente em camundongos modificados pela introdução de TR $\beta$  mutante derivado de mutação proveniente de paciente com resistência aos hormônios da tiróide (41), o que determinou a criação do conceito de que TRb pode funcionar como um gene supressor de tumor. Mais recentemente, demonstraram que esses camundongos apresentam ativação da via AKT, de forma equivalente a FTC em humanos (42). Outro dado novo interessante na gênese do FTC foi a demonstração da perda de expressão do fator supressor de tumor pró-apoptótico (RASSF1) por um mecanismo epigenético, a metilação (43).

Tendo em vista que o desenvolvimento e a progressão dos tumores é causado por um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas no genoma das células somáticas tumorais, a caracterização do perfil de expressão gênica dos tumores em comparação com os tecidos normais tem se tornado uma técnica importante para a descoberta de genes que apresentem potencial diagnóstico, estejam envolvidos na patogênese e possam ser alvos terapêuticos. No FTC, diversos trabalhos têm mostrado genes expressos diferencialmente em relação a outros tecidos que podem ter implicações patogênicas. Cerutti e cols., utilizando a técnica da análise seriada de expressão gênica (SAGE,

do inglês *serial analysis of gene expression*) para achar genes diferencialmente expressos entre FTC e adenoma folicular com o objetivo de utilizá-los para diagnóstico diferencial da “lesão folicular” à citologia aspirativa, demonstrou a presença de genes que são expressos apenas em bibliotecas de FTC e não são encontrados em adenoma folicular (44). Quatro desses genes podem ter implicação patogênica na indução do FTC, *DDIT3* (DNA *damage-inducible transcript*), *ARG2* (*arginase type 2*), *ITM1* (*integral membrane protein 1*) e *C1orf24* (*Chromosome 1 open reading frame 24*). A indução de *DDIT3* promove estimulação de crescimento, diferenciação, invasividade e migração, o que pode estar relacionado à transformação do fenótipo no FTC; a super-expressão de *DDIT3* foi validada por Barden e cols. utilizando outra técnica para a avaliação da expressão diferencial de genes (“*DNA array*”) (45). O gene *ARG2* também pode estar envolvido na patogênese do FTC, pois é importante no metabolismo das poliaminas, vitais para a proliferação celular. O gene *ITM1* codifica uma proteína altamente conservada que apresenta 10-14 domínios atravessando a membrana; esta proteína não contém atividade enzimática, nem é uma proteína de transporte, nem está envolvida na sinalização intracelular; tem sido especulado que se trate de um novo tipo de proteína “permease-transporter” (44). O gene *C1orf24* é um gene marcador de tumor renal e expresso em músculo, pâncreas, cólon e próstata, mas cuja função é ainda desconhecida (44). Além de genes que demonstram super-expressão na análise diferencial, evidenciamos que outros genes são inibidos no FTC em relação a tecidos normais, como o *DCN* (decorin), um proteoglicano rico em leucina implicado em diversos processos biológicos, como organização da matriz extra-celular, ligação de fatores de crescimento e atividade de receptores TK (46).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma compreensão clara da patogênese do câncer diferenciado da tiróide propiciará aos clínicos e cirurgiões métodos melhores para a orientação dos pacientes quanto à necessidade de cirurgia, assim como de sua extensão. Esta nova prática trará uma diminuição de cirurgias desnecessárias em lesões benignas, assim como cirurgias iniciais mais completas em nódulos de tiróide com perfil genético mais agressivo. Além disso, decisões quanto à necessidade de radioiodo, bem como de exploração dos linfonodos, serão feitas com maior propriedade. Prevemos que a avaliação futura dos nó-

dulos de tiróide incluirão a análise molecular, além do estudo citológico, no material obtido por citologia aspirativa guiado por ultra-sonografia, tendo em vista seus benefícios. Os dados já existentes em relação ao PTC (com o uso da pesquisa de BRAF) (24) e o potencial diagnóstico da análise molecular nos casos suspeitos de FTC (44) nos permitem prever que essas ferramentas diagnósticas logo estarão à disposição.

## AGRADECIMENTOS

Para a redação deste trabalho e a elaboração de conceitos sobre a patogênese do câncer de tiróide, os autores agradecem os estímulos decorrentes das discussões científicas mantidas com seus alunos de pós-graduação Liliane Arnaldi, Magnus Dias da Silva, Rosa Paula Biscolla, Adriana Álvares da Silva, Gustavo Guimarães, Cléber Camacho, Gisele Oler, Flávia Latini, Cláudia Nakabashi, Silvia Matsuo, Kátia Ebina, Luciana Martins, Suzana Leoni e Júlio Ricarte. Os dados de trabalhos científicos gerados pelos nossos laboratórios foram realizados com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## REFERÊNCIAS

1. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, eds. **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Glands**. Lyon:IARC Press, **2004**.
2. Surveillance, Epidemiology and End Results, National Cancer Institute. Disponível em: <http://seer.cancer.gov>.
3. Barril N, Tajara EH. Aspectos moleculares do câncer tiroideano. **Arq Bras Endocrinol Metab** **1999**;43:313-24.
4. Maciel RMB. Tumorigênese molecular tiroideana: implicações para a prática médica. **Arq Bras Endocrinol Metab** **2002**;46:381-90.
5. Matsuo SE, Martins L, Leoni SG, Hajjar D, Ricarte-Filho JCM, Ebina KN, et al. Marcadores biológicos de tumores tiroideanos. **Arq Bras Endocrinol Metab** **2004**;48:114-25.
6. Xing M. *BRAF* mutation in thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer** **2005**;12:245-62.
7. Fagin JA. Challenging dogma in thyroid cancer molecular genetics-role of *RET/PTC* and *BRAF* in tumor initiation. **J Clin Endocrinol Metab** **2004**;89:4264-6.
8. Santoro M, Melillo M, Carlomagno F, Vecchio G, Fusco A. Minireview: *RET*: normal and abnormal functions. **Endocrinology** **2004**;145:5448-51.
9. Arighi E, Borrello MG, Sariola H. *RET* tyrosine-kinase signalling in development and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev** **2005**;16(4-5):441-67.
10. Kodama Y, Asai N, Kawai K, Jijiwa M, Murakumo Y, Ichihara M, et al. The *RET* proto-oncogene: a molecular therapeutic target in thyroid cancer. **Cancer Sci** **2005**;96:143-8.
11. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. **Nature** **2002**;417:949-54.
12. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: *BRAF* is a human oncogene. **Cancer Cell** **2004**;6:313-9.
13. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of *BRAF* mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the *RET/PTC-RAS-BRAF* signalling pathway in papillary thyroid carcinoma. **Cancer Research** **2003**;63:1454-7.
14. Hubbard SR. Oncogenic mutations in B-Raf: some losses yield gains. **Cell** **2004**;116:764-6.
15. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the *RAF-ERK* signaling pathway by oncogene mutations of B-*RAF*. **Cell** **2004**;116:855-67.
16. Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, et al. Targeted expression of *BRAFV600E* in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. **Cancer Res** **2005**;65:4238-45.
17. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhães J, et al. *BRAF* mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. **J Pathol** **2004**;202:247-51.
18. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. *BRAF* mutations and *RET/PTC* rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. **Oncogene** **2003**;22:4578-80.
19. Lima J, Trovisco V, Soares P, Maximo V, Magalhães J, Salvatore G, et al. *BRAF* mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. **J Clin Endocrinol Metab** **2004**;89:4267-71.
20. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. *BRAF* mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. **J Clin Endocrinol Metab** **2003**;88:5399-404.
21. Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, Santoro M, Ghandi M, Knauf JA, et al. Low prevalence of *BRAF* mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. **Cancer Lett** **2004**;209:1-6.
22. Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, et al. The *RET/PTC-RAS-BRAF* linear signalling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. **J Clin Invest** **2005**;115:1068-81.
23. Baloch Z, Kumar MS, Lai M, Volpe P, LiVolsi VA, Mandel

- SJ, et al. Rate of BRAF and N-Ras mutations in thyroid nodules undergoing fine needle aspirations. **Thyroid** **2004**;14:745.
24. Salvatore G, Giannini R, Faviana P, Caleo A, Migliaccio I, Fagin JA, et al. Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** **2004**;89:5175-80.
25. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Ghandi M, Zhu Z, Nikiforova MN, et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. **J Clin Invest** **2005**;115:94-101.
26. Oler G, Ebina KN, Michaluart Jr P, Kimura ET, Cerutti J. Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched-lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis. **Clin Endocrinol** **2005**;62:509-11.
27. Vasko V, Hu S, Wu G, Xing JC, Larin A, Savchenko V, et al. High prevalence and possible de novo formation of BRAF mutation in metastasized papillary thyroid cancer in lymph nodes. **J Clin Endocrinol Metab** **2005**;90(9):5265-9.
28. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. **Nat Rev Cancer** **2004**;4:937-47.
29. Collins BJ, Chiappetta G, Schneider AB, Santoro M, Pentimalli F, Fogelfeld L, et al. RET expression in papillary thyroid cancer from patients irradiated in childhood for benign conditions. **J Clin Endocrinol Metab** **2002**;87:3941-6.
30. Corvi R, Martinez-Alfaro M, Harach HR, Zini M, Papotti M, Romeo G. Frequent RET rearrangements in thyroid papillary microcarcinoma detected by interphase fluorescence in situ hybridization. **Lab Invest** **2001**;81:1639-45.
31. Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. **Science** **2000**;290:138-41.
32. Kroll T, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller F, Spiegelman BM. PAX8-PPAR $\gamma$  fusion in oncogene human thyroid carcinoma. **Science** **2000**;289:1357-60.
33. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, et al. Expression of PAX8-PPAR $\gamma$  rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. **J Clin Endocrinol Metab** **2002**;87:3947-52.
34. Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll T, Nikiforov YE. PAX8-PPAR $\gamma$  rearrangement in thyroid tumors. **Am J Sur Pathol** **2002**;26:1016-23.
35. Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, et al. Detection of the PAX8-PPAR $\gamma$  fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. **J Clin Endocrinol Metab** **2003**;88:354-7.
36. Nakabashi CCD, Guimarães GS, Michaluart Jr. P, Ward LS, Cerutti JM, Maciel RMB. The expression of PAX8-PPAR $\beta$  rearrangement is not specific to follicular thyroid carcinoma. **Clin Endocrinol** **2004**;61:280-2.
37. French C, Alexander EK, Cibas ES, Nose V, Laguette J, Faquin J, et al. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. **Am J Pathol** **2003**;162:1053-60.
38. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EA, Dorn GW, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR $\gamma$  rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** **2003**;88:2318-26.
39. Ringel MD, Hayre N, Saito J, Lin JP, Saunier B, Schuppert F, et al. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. **Cancer Res** **2001**;61:6105-11.
40. Kirshner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, et al. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type 1 $\beta$  regulatory sub-unit in patients with the Carney complex. **Nat Genet** **2000**;26:89-92.
41. Kato Y, Ying H, Willingham MC, Cheng S-Y. A tumor suppressor role for thyroid hormone  $\beta$  receptor in a mouse model of thyroid carcinogenesis. **Endocrinology** **2004**;145:4430-8.
42. Kim CS, Vasko VV, Kato Y, Kruhlak M, Saji M, Cheng S-Y, et al. AKT activation promotes metastasis in a mouse model of follicular thyroid carcinoma. **Endocrinology** **2005**;146(10):4456-63.
43. Xing M, Cohen Y, Mambo E, Tallini G, Udelsman R, Ladenson PW, et al. Early occurrence of RASSF1 hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumorigenesis. **Cancer Res** **2004**;64:1365-8.
44. Cerutti JM, Delcelo R, Amadei MJ, Nakabashi C, Maciel RMB, Peterson B, et al. A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. **J Clin Invest** **2004**;113:1234-42.
45. Barden CB, Shister KW, Zhu B, Guiter G, Greenblatt DY, Zeiger MA, et al. Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: results of gene profiling. **Clin Cancer Res** **2003**;9:1792-800.
46. Arnaldi LAT, Borra RC, Maciel RMB, Cerutti JM. Gene expression profiles reveal that DCN, DIO1, and DIO2 are underexpressed in benign and malignant thyroid tumors. **Thyroid** **2005**;15:210-21.

**Endereço para correspondência:**

Rui M.B. Maciel  
Rua Pedro de Toledo 781, 12º andar  
04029-034 São Paulo, SP  
Fax: (11) 5084-5231  
E-mail: rmbmaciel-endo@pesquisa.epm.br